

Р. АВАРМАА, Р. ТАМКИВИ,
Сирье КИЙСЛЕР, Вайми НЫММ

ТОНКОСТРУКТУРНЫЕ ВИБРОННЫЕ СПЕКТРЫ МОЛЕКУЛ ХЛОРОФИЛЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В ТВЕРДЫХ РАСТВОРАХ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ ПЕРЕСТРАИВАЕМОМ ЛАЗЕРОМ НА КРАСИТЕЛЕ

(Представлена К. К. Ребане)

Измерены спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции замороженных растворов хлорофилла *a*, протохлорофилла, феофитина *a* и его Zп-комплекса при $T = 4,2$ К с использованием перестраиваемого лазерного возбуждения. На основе тонкой вибронной структуры определен ряд колебательных частот этой группы родственных молекул.

Введение

Флуоресценция хлорофилла, как функция его состояния *in vivo*, широко применяется для получения информации о первичных фотохимических процессах в фотосинтезе (см., напр., [1]). Спектральные исследования флуоресценции и поглощения важны для изучения электронно-колебательных взаимодействий в возбужденных электронных состояниях хлорофилла и его производных, а также для выяснения механизмов взаимодействия с молекулами растворителя.

В то время как при комнатной и азотной температурах спектры флуоресценции и поглощения хлорофилловых растворов состоят из сравнительно широких полос (≈ 300 см⁻¹), при температуре жидкого гелия (4,2 К) возможно проявление квазилинейчатой структуры [2, 3]. Оказалось, что применение монохроматического возбуждения позволяет наблюдать квазилинейчатую структуру в спектре флуоресценции хлорофилла *a* (Хл *a*) практически в любом растворителе [4]. Впоследствии тонкая структура была обнаружена и для некоторых производных Хл *a* [5, 6].

Возникновение квазилинейчатой структуры в спектре флуоресценции Хл *a* объясняется [4, 5] аналогично обнаруженному в [7] снятию неоднородного уширения с помощью монохроматического возбуждения — преимущественно возбуждаются лишь те молекулы, бесфононная линия которых попадает в резонанс с возбуждающей лазерной линией. * Однако особенностью хлорофиллоподобных молекул является то, что возбуждение охватывает сразу ряд близкорасположенных (в пределах неоднородной ширины) электронно-колебательных (виброн-

* В случае т. н. систем Шпольского само неоднородное распределение содержит узкие пики, обеспечивающие квазилинейчатую структуру даже при «белом» возбуждении. Для хлорофилла такие условия, по-видимому, не реализуются [6].

ных) переходов в спектре поглощения. Это приводит к умножению числа бесфононных линий спектра флуоресценции (подобная особенность спектров флуоресценции экспериментально наблюдалась для ряда молекул [8, 9], элементарная теоретическая трактовка дана в [10]).

Основным достоинством таких многолинейчатых спектров является возможность определения из спектра флуоресценции частот внутримолекулярных колебаний в возбужденном электронном состоянии. Использование лазера на красителе с перестраиваемой частотой позволяет охватывать достаточно широкий интервал частот (в случае Хл *a* и Хл *b* удалось перекрыть всю область внутримолекулярных колебаний [11]). Все же более непосредственно частоты можно определить из спектра возбуждения при монохроматической регистрации. Благодаря применению сканируемого лазерного излучения вместо возбуждения через монохроматор, нам удалось довести спектральное разрешение в настоящей работе до 1 см^{-1} против 7 см^{-1} в [5]. На основе полученных частот провели сравнительное изучение наиболее близких родственных соединений Хл *a*: протохлорофилла (ПХл), феофитина *a* (Фео *a*) и его Zn-комплекса (Zn-Фео *a*), а также Хл *b*.

Методика эксперимента

Хл *a* и Хл *b* выделили из листьев крапивы по известному методу хроматографии на колонке [12], их феофитины — путем обработки HCl и дальнейшего хроматографирования. Zn-Фео *a* получили из Фео *a* в уксусной кислоте с добавлением Zn-ацетата путем кипячения при 70°C . Продукт реакции экстрагировали эфиром, добавляя воду, после чего провели хроматографирование на сахарной колонке. ПХл выделили из семян тыквы. Растворы пигментов в эфире (Э) и в смеси эфир—бутанол 1:1 (ЭБ) использовались при концентрациях от 10^{-6} до 10^{-5} моль/л. Качество пигментов контролировалось по спектрам поглощения на спектрофотометре «Acta MVII».

Спектральные измерения проводились при возбуждении лазером на красителе CR 490 (родамин 6Ж перекрывал область от 585 до 630 нм), который накачивался аргоновым лазером «Spectra-Physics», модель 171. Ширина линии генерации была меньше 1 см^{-1} . Флуоресценция регистрировалась на спектрометре ДФС-24 со спектральным разрешением $0,5\text{ см}^{-1}$.

Результаты и обсуждение

Характерным примером квазилинейчатой структуры при возбуждении в области вибронного поглощения $S_1 \leftarrow S_0$ может служить спектр флуоресценции Zn-Фео *a* на рис. 1. Так как преобладает неоднородное уширение, то при монохроматическом возбуждении наблюдается эффект размножения линий [8]. Все линии в спектре флуоресценции в сущности чисто-электронны, поскольку взаимодействие с колебаниями основного состояния весьма слабо. Поэтому интервалы от возбуждающей линии до линий свечения соответствуют частотам колебаний ω' в электронном состоянии S_1 . Ширина наиболее узких линий составляет 5 см^{-1} , что значительно превышает ширину аппаратной функции, т. е. имеется остаточное неоднородное уширение колебательных уровней. Из-за того, что возбуждение резонансно не с 0—0-переходом, а с определенными вибронными переходами, однородная ширина, как правило, при такой методике не достигается [10, 13].

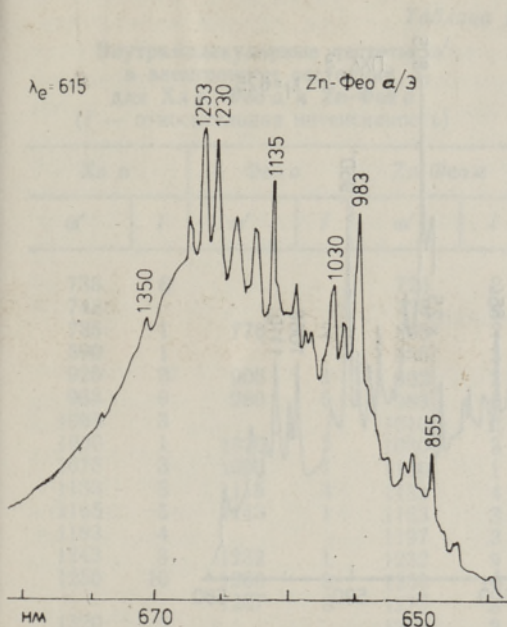


Рис. 1. Спектр флуоресценции Zn-Фео *a* в эфире при монохроматическом лазерном возбуждении на частоте $\nu_e = 16\,256\text{ см}^{-1}$. Около линий указаны вычисленные из спектра частоты колебаний. $T = 4,2\text{ К}$ на всех рисунках.

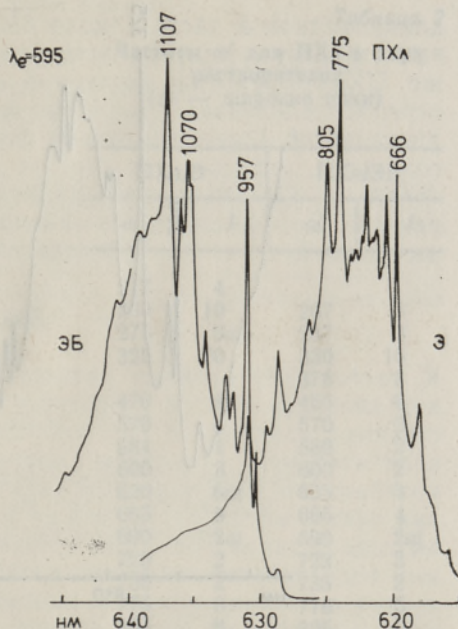
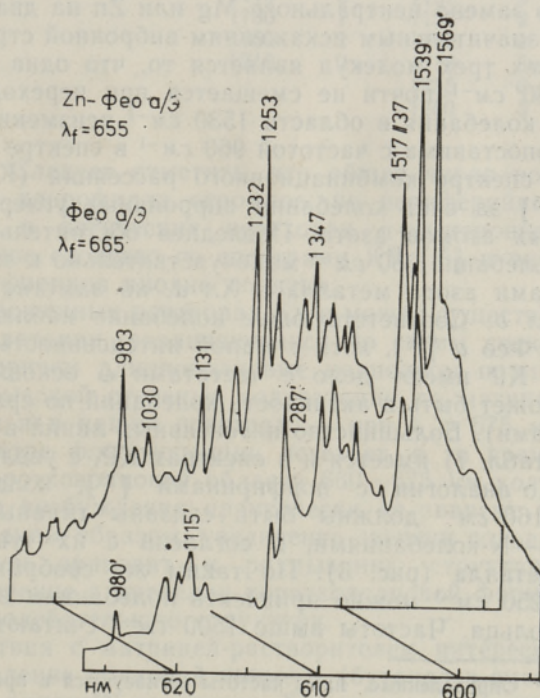


Рис. 2. Спектры флуоресценции ПХл в эфире (справа) и в смеси эфир — бутанол (слева) при возбуждении $\nu_e = 16\,802\text{ см}^{-1}$.

Рис. 3. Спектры возбуждения флуоресценции Фео *a* (внизу, частоты со штрихом) и Zn-Фео *a* в эфире при регистрации $\nu_f = 15\,034$ и $15\,263\text{ см}^{-1}$ соответственно.

Впервые удалось получить также квазилинейчатый спектр флуоресценции ПХл (рис. 2). Тонкость заключалась в том, что при возбуждении в состояние S_2 или выше тонкая структура отсутствует [6], очевидно, из-за недостаточной корреляции между энергиями разных состояний [14].

Богатая структура наблюдалась в спектрах возбуждения (рис. 3 и 4), из которых были определены колебательные частоты ω' в наиболее актуальной высокочастотной обла-



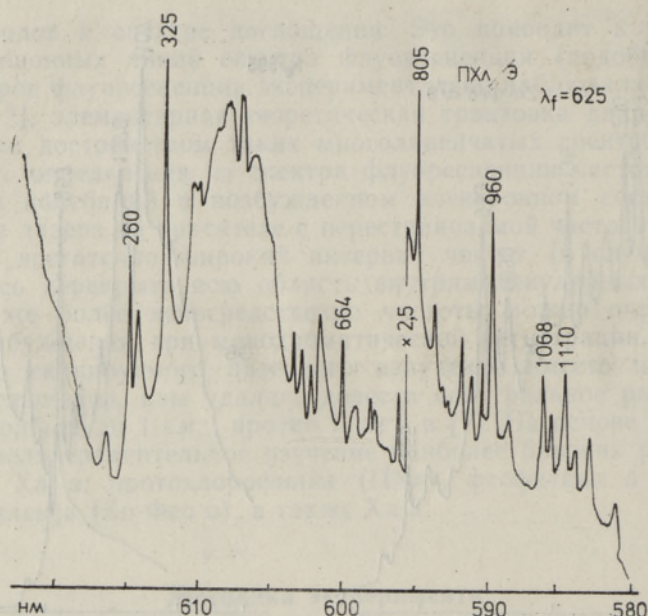


Рис. 4. Спектр возбуждения ПХл в эфире при регистрации $\nu_f = 15996 \text{ см}^{-1}$.

сти**. Частоты, средние из 2—4 спектров при разных длинах волн регистрации, сведены в табл. 1 и 2. Точность определения частот 2 см^{-1} .

Частоты Хл *a* и Zп-Фео *a* достаточно хорошо сопоставимы (табл. 1), но замена центрального Mg или Zп на два водорода в Фео *a* приводит к значительным искажениям вибронной структуры (рис. 3). Общим для всех трех молекул является то, что одна из сильнейших линий около 980 см^{-1} почти не смещается при переходе от молекулы к молекуле и колебания в области 1530 см^{-1} неизменно активны. Частота 980 см^{-1} сопоставима с частотой 960 см^{-1} в спектре ПХл и с аналогичным пиком в спектре комбинационного рассеяния (КР) порфиринов, отнесенным [15] за счет колебания пиррольных углеродов, без участия центральных атомов азота. Последнее обстоятельство согласуется с тем, что колебание 980 см^{-1} малочувствительно к замещениям связанного с атомами азота металла в Хл *a*, но заметно изменяется при переходе к Хл *b*. Соответствующее колебание наблюдалось в спектре КР Хл *a* и Фео *a* [16], хотя с малой интенсивностью (не следует забывать, что в КР имеют дело с частотами ω основного состояния S_0 , различна может быть и активность колебаний по сравнению с вибронными спектрами). Большинство интенсивных линий в области начиная с 1130 см^{-1} (табл. 1) имеется и в спектрах КР, с увеличением частот на $\approx 10 \text{ см}^{-1}$. По аналогии с порфиринами [15], колебания в интервале 1130 — 1160 см^{-1} должны быть связаны главным образом с пиррольными C—N-колебаниями, в согласии с их чувствительностью к удалению металла (рис. 3). По таким же соображениям группу линий около 1250 см^{-1} можно приписать колебаниям внутренней зоны порфинового кольца. Частоты выше 1500 см^{-1} считаются включающими колебания

** Определенные нами частоты согласуются в пределах 5 см^{-1} с данными [11]. Низкочастотная область анализировалась в [6].

Таблица 1

Таблица 2

Внутримолекулярные частоты ω'
в электронном состоянии S_1
для Хл *a*, Фео *a* и Зп-Фео *a*
(*I* — относительная интенсивность)

Частоты ω' для ПХл в двух
растворителях
(ш — широкие пики)

Хл <i>a</i>		Фео <i>a</i>		Зп-Фео <i>a</i>		ПХл/Э		ПХл/ЭБ	
ω'	<i>I</i>	ω'	<i>I</i>	ω'	<i>I</i>	ω'	<i>I</i>	ω'	<i>I</i>
738	6			725	2	217	4		
748				735	6	260	10	267	3
785	1	770	2	805	2	275	6ш	287	3
890	1			855	3	325	20	330	10
925	3	906	1	902	2			375	3
983	9	980	5	983	6	470	6	466	4
1005	3			1010	2	570	4	570	2
1030	1	1070	2	1030	3	584	4	580	2
1075	3	1090	1	1100	1	600	3	600	2
1133	5	1115	3	1133	4	620	6ш	625	3
1165	5	1143	1	1163	3	665	8	665	4
1193	4			1197	3	690	2ш	690	2ш
1243	3	1232	1	1232	9	720	2	723	3
1250	10	1260	3	1253	10	730	2	735	2
		1287	5	1275	3	775	8	776	5
1320	2			1325	3	805	8	805	5
1345	10	1357	4	1347	4	845	2	845	1
1372	7	1378	4	1370	2	905	3	895	2
1397	3	1400	1	1404	3	920	3	934	3
1415	2	1420	2	1422	3	943	3		
1510	10	1508	3	1515	10	960	9	957	10
1530	5	1539	10	1537	6			982	1
		1569	10			1000	1	993	1
1655	1			1655	1	1068	3	1035	1
						1085	2	1070	4
						1110	3	1107	5
						1130	1	1135	2
						1160	2	1150	3
						1210	2	1210	8ш
								1235	6
								1260	3

метиновых мостиков [15, 16]. Следует отметить, что общее число возможных колебаний молекул хлорофилла огромное, но периферийные группы заведомо неактивны в оптических переходах π -электронной системы. Поэтому качественное сходство со спектрами КР [15] и вибронными спектрами [17] порфиринов вполне понятно.

Известно [18], что в замороженных растворах Хл *a* может существовать в разных формах сольватации, различающихся по своим спектральным характеристикам, причем длинноволновые подполосы приписываются формам с более высокой степенью сольватации по магнию. Две формы обнаруживаются и в наших спектрах — при $\lambda > 675$ нм линейчатая структура в спектре флуоресценции исчезает, в то время как для флуоресценции в коротковолновой области 660—675 нм колебательная структура спектра возбуждения практически не зависит от длины волны регистрации. Таким образом, увеличение степени сольватации Хл *a* с растворителем приводит к размыванию структуры спектра, а неоднородное уширение в пределах коротковолновой формы сольватов мало влияет на колебательную структуру.

В отношении взаимодействия с матрицей-растворителем интересно сравнить Хл *a* и ПХл. Добавление полярной примеси (бутанол в смеси ЭБ) не оказывало особого влияния на спектр Хл *a*: интенсивность

длинноволновой части (около 680 нм) возрастала, однако колебательная структура спектров оставалась практически неизменной. В случае же ПХл добавление полярной примеси приводило к значительному перераспределению в спектре флуоресценции (рис. 2). Здесь линии дисольватов (длинноволновой формы) такие же четкие, как и у моно-сольватов, однако ряд частот оказался различным у двух форм (табл. 2). Следовательно, механизмы сольватации Хл *a* и ПХл неодинаковы. Возможно, эти различия объясняются образованием водородных связей через два дополнительных атома водорода у Хл *a*.

Заключение

К настоящему времени решены принципиальные вопросы возникновения квазилинейчатой структуры в вибронных спектрах Хл *a* и его родственных соединений при монохроматическом возбуждении. На основе колебательной структуры определены частоты внутримолекулярных колебаний в возбужденном электронном состоянии. На основе сравнения частот молекулы Хл *a* и ее наиболее близких производных сделаны выводы о характере соответствующих колебаний. Продолжение подобных исследований позволит, с одной стороны, получить данные о более тонких аспектах внутри- и межмолекулярного взаимодействия, а с другой, — разрешить такие весьма важные для данного класса объектов вопросы, как чисто однородная ширина линий и скорость колебательной релаксации.

Авторы искренне благодарны К. К. Ребане за обсуждение результатов настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lavorel, J., Etienne, A.-L., In: Topics of Photosynthesis, 2, Primary Processes of Photosynthesis, Amsterdam, Elsevier, 1977, p. 203—268.
2. Литвин Ф. Ф., Персонов Р. И., Коротаев О. Н., Докл. АН СССР, 188, № 5, 1169—1171 (1969).
3. Авармаа Р., Ребане К., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 22, № 1, 108—110 (1973).
4. Авармаа Р., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 23, № 1, 93—94 (1974).
5. Авармаа Р., Ребане К., Stud. biophys., 48, № 3, 209—218 (1975).
6. Авармаа Р. А., Мауринг К. Х., Ж. прикладной спектроскопии, 28, № 4, 658—662 (1978).
7. Персонов Р. И., Альшиц Е. И., Быковская Л. А., Письма в ЖЭТФ, 15, вып. 10, 609—612 (1972).
8. Ребане К. К., Авармаа Р. А., Гороховский А. А., Изв. АН СССР, Сер. физ., 39, № 9, 1793—1800 (1975).
9. Альшиц Е. И., Персонов Р. И., Стогов В. И., Изв. АН СССР, Сер. физ., 39, № 9, 1918—1921 (1975).
10. Авармаа Р., Изв. АН ЭССР, Физ. Матем., 23, № 3, 238—247 (1974).
11. Fünfschilling, J., Williams, D. F., Photochem. Photobiol., 26, № 1, 109—113 (1977).
12. Тыниссоо В., Тамкиви Р., Изв. АН ЭССР, Хим., 27, № 4, 219—223 (1978).
13. Gogokhovskii, A. A., Kikas, J., Opt. Commun., 21, № 2, 272—274 (1977).
14. Саари П. М., Тамм Т. Б., Изв. АН СССР, Сер. физ., 39, № 11, 2321—2325 (1975).
15. Гладков Л. Л., Градюшко А. Т., Ксенофонтова Н. М., Соловьев К. Н., Старухин А. С., Шульга А. М., Ж. прикладной спектроскопии, 27, № 3, 506—513 (1977).
16. Lutz, M., J. Raman Spectrosc., 2, № 5, 497—516 (1974).
17. Arabei, S. M., Shkirman, S. F., Solovyov, K. N., Yegorova, G. D., Spectrosc. Lett., 10, № 9, 677—697 (1977).
18. Hevesi, J., Singhal, G. S., Spectrochim. acta, 25A, № 11, 1751—1758 (1969).

R. AVARMAA, R. TAMKIVI, Sirje KIISLER, Vaimi NÖMM

**KLOROFÜLLI JA LÄHEDASTE ÜHENDITE PEENSTRUKTUURSED
VIBROONSPEKTRID TAHKETES LAHUSTES ÜMBERHÄALESTATAVA
VÄRVLASERIGA ERGASTAMISEL**

On mõõdetud *a*-klorofülli, protoklorofülli, *a*-feofütiini ja selle Zn-kompleksi fluorestsentsi- ja ergastusspektreid külmutatud lahustes temperatuuril 4,2 K, kasutades ümberhäälestatavat laserergastust. Vibroonest peenstruktuurist on määratud rida nimetatud ühenditerühma võnkesagedusi. On võrreldud eri molekulide sagedusi omavahel ja porfüriinide sagedustega ning tehtud järeldusi mõnede aktiivsete võnkumiste iseloomu kohta. Polaarse lahusti mõju järgi *a*-klorofülli ja protoklorofülli spektrite struktuurile on leitud nende molekulide solvateerumismehhanismid erinevad olevat.

R. AVARMAA, R. TAMKIVI, Sirje KIISLER, Vaimi NÖMM

**FINE-STRUCTURED VIBRONIC SPECTRA OF CHLOROPHYLL
AND RELATED MOLECULES IN SOLID SOLUTIONS
UNDER TUNABLE DYE LASER EXCITATION**

Fluorescence and excitation spectra of frozen solutions of chlorophyll *a*, protochlorophyll, pheophytin *a* and its Zn-complex were measured at 4.2 K, using tunable dye laser excitation. A number of vibrational frequencies of this group of related molecules was determined from the vibronic structure. The frequencies of different compounds were compared mutually, also with corresponding frequencies of porphyrins, and conclusions about the character of some vibronically most active vibrations have been drawn. From the influence of the polar solvent on the structure of the spectra of chlorophyll *a* and protochlorophyll, the solvation mechanisms for the two compounds were found to be different.